

Aus: dem II. Anatomischen Institut der Freien Universität Berlin
Direktor: Professor Dr. med. Willy Schwarz

**MORPHOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN DER DESMALEN
OSTEOGENESE UNTER BESONDERER BERÜCKSICHTIGUNG
DES OS PARIETALE BEI RATTENFETEN**

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Margarete Helga Steiner, geb. Brauer
aus Posen

1972

Aus: dem II. Anatomischen Institut der Freien
Universität Berlin
Direktor: Professor Dr. med. Willy Schwarz

Morphologische Untersuchungen der desmalen
Osteogenese unter besonderer Berücksichti-
gung des Os parietale bei Rattenfeten

Inaugural - Dissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Margarete Helga Steiner, geb. Brauer
aus Posen

Referent: Professor Dr. med. Hans-Joachim M e r k e r

Korreferent: Professor Dr. med. Willy S c h w a r z



Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fachbereiche
der Freien Universität Berlin

Promoviert am: 10.4.1972

Für die freundliche Überlassung des Disserta-
tionsthemas, die stete Bereitwilligkeit zu
Diskussionen und die Unterstützung durch Rat
und Tat danke ich Herrn Professor Merker.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41553616_0109

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Einleitung	1
Material und Methoden	12
Befunde	15
Diskussion	24
Zusammenfassung	30
Tabellen und Abbildungen	
Literaturverzeichnis	

Einleitung:

Die Skelettentwicklung des Menschen, die in der siebten bis achten Embryonalwoche beginnt, ist in ihren morphologischen Grundzügen bekannt. So wissen wir, daß auf zwei Arten die Verknöcherung erfolgen kann: 1. enchondral oder indirekt - das Ergebnis ist der Ersatzknochen, und 2. desmal oder direkt - es entsteht der Bindegewebsknochen. In beiden Fällen geht die Knochenbildung vom Mesenchym aus und die knochenbildenden Zellen leiten sich von Mesenchymzellen her.

Bei der enchondralen Ossifikation differenziert sich der hyaline Vorknorpel des Primordialskeletes aus dem Blastem, wird dann mineralisiert, wieder abgebaut und schließlich durch Einwanderung einer zweiten Mesenchymzellgeneration knöchern ersetzt. Wie sieht das am Beispiel eines langen Röhrenknochen aus? Um den Diaphysenbereich des knorpelig vorgebildeten Knochenmodells differenzieren sich die Mesenchymzellen des Perichondriums zu Osteoblasten, die eine oberflächliche, grobfaserige Manschette aus Bindegewebsknochen aufbauen. Sie dient als Stütze und der Formerhaltung, wenn im Innern durch Resorptionsvorgänge der Knorpel abgebaut und durch Knochen ersetzt wird. Durch diese Knochenmanschette geprägt, bildet sich von der Diaphyse zur Epiphyse eine charakteristische Zoneneinteilung:

a) Zone des Knorpelabbaus und der enchondralen Knochenbildung:

Die Ernährung der Vorknorpel-Chondrozyten

wird bei zunehmender Mineralisation der Interzellulärsubstanz nicht mehr gewährleistet, sie gehen zugrunde. Von der inneren Schicht des Periosts dringt gefäßhaltiges Mesenchym durch die Manschette in den Knorpel, das Chondroklasten für den Knorpelabbau und Osteoblasten für den Knochenaufbau liefert. An den Resten der mineralisierten Knorpelzweischensubstanz reihen sich die Osteoblasten auf und bilden Osteoidsäume. In den freien Räumen (primäre Markhöhle) liegt kapillarreiches mesenchymales Gewebe (primäres Knochenmark).

b) Die anschließende Zone des grobblasigen Knorpels ist in den marknahen Lagen schon mineralisiert und zeigt pyknotische Kerne und deutliche Vakuolenbildung als Zeichen des Absterbens.

c) Die Zone der Knorpelsäulen ist als eigentliche Wachstums- und Proliferationsschicht anzusehen. Die Knorpelzellen sind durch den Druck der peripheren Knochenmanschette in parallelen Säulen angeordnet.

d) Der hyaline Knorpel der Epiphysen "ruht", d.h. er ist von den Ossifikationsvorgängen noch nicht betroffen bzw. hier spielen sich noch keine heftigen mitotischen Aktivitäten ab. Die Ossifikation in den Enden der Röhrenknochen (Epiphysen) erfolgt von sogenannten Knochenkernen aus zentrifugal, ohne die Gelenkoberflächen mit einzubeziehen. Sie bleiben zeitlebens hyalinknorpelig. Solange das Längenwachstum noch nicht abgeschlossen

ist (bis jenseits der Pubertät), befindet sich zwischen epiphysärer und diaphysärer Ossifikationszone ein knorpeliger Spalt - die Epiphysenfuge - , der zu proliferativem Wachstum fähig ist. Die Epiphysenkerne entstehen vorwiegend postnatal mit Ausnahme der distalen Femur- und proximalen Tibiakerne, die im letzten Fetalmonat auftreten (Reifezeichen).

Bei der *d e s m a l e n* oder *d i r e k t e n* Ossifikation, zu der auch die bereits erwähnte perichondrale Ossifikation im Diaphysenbereich gehört, differenzieren sich die Mesenchymzellen ohne Durchlaufen eines Knorpelstadiums direkt zu Osteoblasten. Auf diese Weise entstehen die Seitenteile und das Dach des Schädels, ein großer Teil des Gesichtsschädels und die Clavikeln. Postnatal differenzieren sich große Anteile der Bindegewebsknochen in den mechanisch stabileren Lamellenknochen, der weniger Osteozyten und Fasern, jedoch mehr verkalkte Interzellulärsubstanz enthält. Beim erwachsenen Menschen kommt grobgeflechtiger Faserknochen nur noch an wenigen Orten vor, z.B. im knöchernen Labyrinth, im äußeren knöchernen Gehörgang sowie den Sehnen- und Bänderansätzen (BUCHER, 1970; BARGMANN, 1967; KNESE, 1963 b; MERKER, 1961, 1970).

Verglichen mit den zahlreichen Publikationen über die morphologischen Vorgänge während der enchondralen Ossifikation sind die Arbeiten über die desmale Ossifikation äußerst spärlich

und befassen sich vorwiegend mit der periostalen Ossifikation (HARTMANN, 1910; GRAUMANN, 1951; AMPRINO, 1963; ASCENSI, 1959; ASCENSI et al., 1967; KNESE, 1956; KNESE et KNOOP, 1958).

In gleicher Weise wurde bisher das Os parietale in der embryologischen und histologischen Literatur vernachlässigt. Eine exakte zytologische Studie der fetalen Entwicklung fehlt bei den meisten Tierarten oder berücksichtigt vorwiegend makroskopische Befunde (MAIR, 1929; DZIALLAS, 1954, 1958; FRICK et HECKMANN, 1955; VILMANN, 1968; WRIGHT et al., 1958; YOUSSEF, 1969).

Das Os parietale entstammt wie die anderen Deckknochen (Bindegewebsknochen) des Schädeldaches phylogenetisch dem Dermatocranium (Exocranium), das aus dem Hautknochenpanzer der ältesten Vertebraten (Cephalaspiden) gebildet wird. Zur Entstehung des definitiven Schädels—des Osteocranium—vereinigen sich die Deckknochen mit den Ersatzknochen des knorpelig vorgebildeten Chondrocranium (Endocranium), das von dem knorpeligen Endoskelet der Cephalaspiden ausgeht (STARCK, 1965).

Funktionell gehört das Os parietale zum Neurocranium, das bei den niederen Vertebraten eine teils offene, teils geschlossene Skeletkapsel für Hirn, Augen, Ohren und Nase darstellte und aus Dach und Basis besteht. Das Viscero- oder Splanchnocranium (Gesichts_

schädel) läßt sich dagegen auf das spangenförmig aufgebaute Kiefern- und Kiemenbogenskelet aus der Wand des Vorderdarmes der niederen Vertebraten zurückführen. "Zum Aufbau des menschlichen Schädels werden Skeletteile visceraler und neuraler Herkunft ebenso verwendet wie Knochen des Dermato- und Endocraniums" (STARCK, 1965).

Für das Auftreten der Knochenkerne in den Deckknochen des Schädelbereiches werden erbliche wie funktionelle Faktoren verantwortlich gemacht, deren Wirkungsmechanismus jedoch nach wie vor ungeklärt ist.

GRAUMANN (1951) stellte bei der Untersuchung embryonaler menschlicher Schädel (Fetlänge 20 - 50 mm) fest, daß der Bindegewebsknochen in sogenannten "Auflockerungszonen" entsteht, die durch die Mechanik zugfester, divergent verlaufender Oberflächenlamellen zwischen diesen entfaltet werden. Die Zellen in den Randgebieten dieser Auflockerungszonen differenzieren sich zu Osteoblasten.

DZIALLAS (1954) konnte an einem ähnlichen Material nachweisen, daß die Ossifikation des Os parietale von zwei isolierten Zentren aus und in enger Anlehnung an das Gefäßsystem der Diploevenen erfolgt. Die ersten schollenartig angeordneten Knochenbälkchen treten im basalen Kern erst auf, nachdem die Diploevene aus dem Sinus sigmoideus in die Knochenmatrix des Ossifikationsgebietes (Angulus mastoideus Gegend) eingesproßt ist.

Aber auch das weitere Wachstum über Netzwerkbildung, später radiärer Anordnung um die Veneneintrittsstelle und Ausbreitung cranialwärts bis zur Vereinigung mit dem oberen Kern folgt der "zeitlichen Priorität der Venenentwicklung".

Arbeiten an geburtsreifen Kaninchenschädeln (FRICK et HECKMANN, 1955) und an etwas jüngeren Albinorattenembryonen (YOUSSEF, 1969) ergaben, daß das Os parietale schon prenatal die definitive anatomische Konturierung des Erwachsenenknorpels und allseitigen Kontakt zu den benachbarten Deckknochen erreicht. In der Medianebene besteht eine enge Berührung mit dem Os parietale der Gegenseite. Die Vorderkanten sind durch die bindegewebige Coronarnaht von den Ossa frontalia getrennt und bilden in der Mittellinie mit ihnen die große Fontanelle. Die Lambdanaht trennt die Hinterflächen von dem in diesem Stadium schon unpaar gewordenen Os interparietale und läuft in der Knochenmittellinie in die kleine Fontanelle aus. Lateral wird das Os parietale vom Os squamosum überlappt, überdeckt aber selbst zu einem großen Teil ventral die knorpelige Parietalplatte.

WRIGHT et al. (1958) verdanken wir eine ausgezeichnete graphische Darstellung des zeitlichen Ablaufs dieser drei morphologisch wichtigen Schritte: Auftreten der Ossifikationskerne, Ausbreitung und Erreichen der definitiven Gestalt. Bei Long-Evans-Ratten traten im Os parietale und frontale gleich-

zeitig Ossifikationskerne auf (siehe auch ähnliche Befunde von RAJTOVA, 1969 am Meer-schweinchen) und zwar am 16. Tag, die einen halben Tag später - ebenfalls gleichzeitig - mit ihrer Expansion beginnen. Die definitive Gestalt wird vom Parietale am 19. Tag erreicht.

Angesichts der Tatsache, daß die desmale Ossifikation die Entwicklung des Schädeldaches prägt und das Os parietale in seiner Ausdehnung den größten Teil des Daches ausmacht, ist die Bedeutung einer exakten zytologischen Beschreibung für die Beurteilung und Erkennung von teratogenen Schäden offensichtlich. Da sich die vorhandene Literatur - wie bereits erwähnt - fast vorwiegend mit der periostalen Osteogenese beschäftigt, die funktionell sicher anderen Einflüssen ausgesetzt ist als die dem Druck des wachsenden Hirns folgende Verknöcherung des Schädeldaches, ist es interessant zu wissen, ob und inwieweit der zeitliche Ablauf und die Ultrastruktur an beiden Orten übereinstimmt. Auf den Vorgang der Mineralisation soll dabei besonders Gewicht gelegt werden.

Dank der elektronenmikroskopischen Arbeiten von ASCENSI (1957), ASCENSI et al. (1967), KNESE et KNOOP (1958), KNESE (1963 a), MERKER (1961, 1967, 1970) über die Ultrastruktur des Bindegewebes und seine Mineralisation sind einige markante Punkte in diesem komplexen Geschehen aufgeklärt (Lit. siehe MERKER, 1970, 1969; SCHWARZ, 1964).

1. Nucleationsort für die Skeletminerale ist die Interzellulärsubstanz (ICS), die morphologisch aus Kollagenfibrillen und Interfibrillärsubstanz (Grund- oder Kittsubstanz), biochemisch aus Kollagen, Elastin und dem Mucopolysaccharid - Proteinkomplex (Glucosaminoglykane = GAG, Proteoglykane = PG) besteht.

2. Die ICS wird in Form von Vorstufen intrazellulär von den "aktiven" Mesenchymzellen gebildet.

3. Kollagen und GAG werden getrennt über den Golgi-Apparat oder direkt in den Extrazellularraum sezerniert.

4. Dort laufen die verschiedenen Schritte der Fibrillenentwicklung ab: marginale Kondensation, Nucleation, Filamentbildung, mit Hilfe der GAG Fibrillenbildung und schließlich Fibrillenbündelung (Dickenwachstum und Zusammenlagerung).

Der Hydroxylapatit ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) stellt die solide Phase des $(\text{Ca})_2(\text{PO}_4)_3 - \text{H}_2\text{O}$ - Systems dar. Er besitzt eine Wasserschale aus zwei verschieden fest gebundenen Anteilen und eine einachsige negative Doppelbrechung. Seine sterische Anordnung geschieht in einem bestimmten Raumgitter, das durch Gitterkonstanten (Achsenrichtung und zugehörigen Winkel, Identitätsabstände) definiert ist (KNESE, 1963 a; POSENER, 1969). Die optische Achse des Apatits soll nach VON EBNER (1887) der Längsachse der einachsigen positiv doppelbrechenden Kollagenfibrillen parallel verlaufen. Bis heute ist die Struktur der

Knochenmineralien noch nicht völlig geklärt. Es existieren abweichende Angaben über Form (Waben, Platten, Nadeln), Größe, Keimbildung, Wachstum (Aggregation, Apposition), Wachstumsbeendigung und schließlich über die Beziehung zu den Fibrillen bzw. der Kittsubstanz. Da die Kollagenfibrillen Faserkristallite darstellen, die in ihren Gitterkonstanten weitgehend mit denen der Apatite übereinstimmen, wäre eine Verknüpfung beider Strukturen im Sinne der mineralogischen Epitaxie (gesetzmäßige Verwachsung ungleichartiger Kristalle) denkbar. Die Epitaxie ist an native Fibrillen mit einer Periode von 640 Å gebunden, die schon in Bande und Interbande unterteilt ist. Sie könnte aber auch durch perifibrilläre Substanzen wie a) anionische Chondroitinsulfat-Gruppen (AMPRINO, 1955 u.a.), b) Chondroitinsulfat-Kollagen-Komplexe (SOBEL, 1955), c) phosphorylierte Polysaccharide (DI STEFANO et al., 1953) bewirkt werden. Unbekannt ist, ob Osteoblasten (und Chondrozyten) unmittelbar an der Mineralablagerung beteiligt sind.

Ein Modell für den möglichen Wirkungsmechanismus des Mucopolysaccharid-Protein-Komplexes bei der Mineralisation wurde von THIELE und ANDERSEN (1955) an ionotropen Gelen demonstriert. Die ionotropen Gele dienen in ihrer Eigenschaft als Polyelektrolyte schwerlöslichen Verbindungen als Leitstrukturen für eine geordnete, anisotrope, intermizellare Kristallisation. Diese beruht auf einem Ionenaustausch mit dem am Gelgerüst

gebundenen Gegenion. Das Kristallwachstum wird auf unklare Weise von dem relativ unvergänglichen Kollagengerüst gebremst. Die Kollagenfibrillen reifen aus, kenntlich an der Periodenvergrößerung und der Dickenzunahme, sie treten zu Bündeln zusammen, in denen die nesterartigen Mineraldepots teilweise miteinander verschmelzen (KNESE, 1963 a).

Nach KNESE (1963 a) sieht die Arbeitshypothese der Korrelation verschiedener Prozesse bei der Bildung und Reifung des Knochengewebes zusammengefaßt wie folgt aus:

1. Osteoblasten geben gleichzeitig Material für den Aufbau von Kollagenfibrillen und Mucopolysacchariden in den Interzellularraum.

2. Die Mucopolysaccharide (MPS) bewirken eine Aggregation der Kollagenfibrillen als Gerüst des Gewebes. Die MPS sind zunächst noch an Fibrillen gebunden. Sie ermöglichen als Polyelektrolyte in einer geordneten, intermizellaren Kristallisation

3. eine Bildung von Kristallkeimen in regellosem Nesterabstand. Die Folgen sind:

- a) Wasserverarmung des Gewebes, da der Platz, den das Wasser am MPS-Molekül innehatte, nun durch Kristalle eingenommen wird.

- b) Verminderung der MPS, die sich in Abnahme des Hexosamins gegenüber Kollagen ausdrückt (SOBEL et al., 1953/54).

4. Das relativ unvergängliche Kollagen-gerüst begrenzt auf unklare Weise das Kristallwachstum.
5. Die Kollagenfibrillen reifen aus (Periodenvergrößerung, Dickenzunahme).
6. Mit der Änderung des gebildeten Volumens geht eine Änderung der prozentualen Anteile der einzelnen Komponenten einher, sichtbar an der Abnahme der Flächendichte von Fibrillen, Osteozyten und der HAVERS'schen Kanäle pro Flächeneinheit.

Anliegen dieser Arbeit soll es nun sein, anhand von elektronenmikroskopischen Untersuchungen bei der Ratte die Morphologie der desmalen Knochenbildung mit verschiedenen Methoden in ihrem Ablauf von der Osteoblastendifferenzierung bis zum fertigen Faserknochen an den Röhrenknochen der oberen Extremität (Humerus) und am Os parietale bei Ratten aufzuzeigen. Dabei soll eine Grundlage erarbeitet werden zum morphologischen Verständnis der Entstehung und Beurteilung von Mißbildungen.

MATERIAL UND METHODEN

Die verwendeten Feten stammen von Muttertieren eines Ratten-WISTAR-Inzuchtstammes (PADERBORN FW 68). Nach Dekapitation der Muttertiere wurden die Feten sofort schnittentbunden und in toto fixiert. In der Fixationsflüssigkeit erfolgte dann die weitere Zerlegung. Unsere Untersuchungsobjekte waren 1. die Konvexität des Schädels, die mit einem Horizontalschnitt oberhalb der Augen abgetrennt wurde, und 2. die oberen Extremitäten. Beide Stücke blieben im Laufe der weiteren Präparation erhalten, um eine bessere Orientierung im Schnitt zu gewährleisten. Die Fixationslösung bestand aus 3% Glutaraldehyd und 3% Paraformaldehyd, gepuffert mit einem 0,1 molaren Cacodylat-Puffersystem (pH 7,2). Nach einer 2 bis 3 stündigen Fixationsdauer und mehrmaligem Waschen in Pufferlösung schloß sich eine Nachfixation in gepufferter OsO_4 -Lösung (1%-ig) an. Die Einbettung erfolgte nach Entwässerung in der Acetonreihe in Mikropal. Die Schnitte wurden an LKB-Ultratomen in REICHERT-Mikrotomen hergestellt und mit Uranylacetat-Bleiacetat kontrastiert. Mit Hilfe von SIEMENS-Elmiskopen vom Typ I und Ia machten wir die elektronenmikroskopischen Aufnahmen. Zur Beurteilung benutzten wir 3 1/2-fache positive Papierabzüge. Zwecks Orientierung im Schnitt und Suche nach geeigneten Stellen für die elektronenmikroskopische Untersuchung wurden sogenannte Semidickschnitte angefertigt

und für 1 Minute bei 60 Grad C mit Giemsa-Lösung gefärbt.

Um vergleichbare Ergebnisse bei der Untersuchung der Skelettentwicklung zu erhalten, war es notwendig, den Kopulationstermin und damit den Befruchtungstermin möglichst genau festzusetzen. Aus diesen Gründen wurden die Tiere bei einem verschobenen Tag-Nacht Rhythmus gehalten und in der Zeit von 7.30 bis 10 Uhr gepaart. Da bereits um 8 Uhr 80% der Rattenweibchen spermienpositiv sind, setzen wir diesen Zeitpunkt als Nullwert an. Die anschließenden 24 h werden als Tag 0 bzw. als 1. Tag bezeichnet. Zwischenzeiten können - in Stunden ausgedrückt - von 8 Uhr an gerechnet werden. In dieser Arbeit wurde Material von Tag 11 bis Tag 21 berücksichtigt.

Neben diesen elektronenmikroskopischen Techniken benutzten wir auch die klassischen lichtmikroskopischen und histochemischen Methoden. Für die lichtmikroskopischen Untersuchungen wurden die Feten in BOUIN'scher Lösung fixiert, in Paraplast eingebettet und folgendermaßen gefärbt: H.E., VAN GIESON, PAS, Trichrom und Methylenblau bei verschiedenen pH-Werten. Als besonders geeignet zur Darstellung der Mineralisationsprozesse erwies sich der enzymhistochemische Nachweis einer alkalischen Phosphatase (TELLER et al., 1971). Für diese Untersuchung wurde das Gewebe in der oben beschriebenen glutaraldehydhaltigen Lösung fixiert, gefrier-

geschnitten und in einer Lösung mit folgender Zusammensetzung für 30 Minuten inkubiert: 4 mg Naphthol-As-Cl-Phosphat, 0,2 ml Dimethyl-Formamid, 25 ml 0,2 m Acetat-Puffer (pH 7 und 8), 35 mg Fast-Red-TR-Salt und 0,1 ml 10%-ige $MgCl_2$.

Zur besseren Darstellung der Größenverhältnisse während der Skeletentwicklung verwendeten wir noch die Alizarin-Rot-Aufhellungsmethode. Dabei wird die mineralisierte Knochensubstanz durch Alizarin-Rot angefärbt und das übrige Gewebe mittels NaOH aufgehellt, d.h. durchsichtig gemacht. Die Lagerung und Betrachtung erfolgt dann in Glycerin.

BEFUNDE

I. Lichtmikroskopisches Bild und Aufhellungs- befunde:

Da im folgenden vorwiegend auf Befunde von Os parietale und Humerus zurückgegriffen wird, sollen bei der anschließenden lichtmikroskopischen Beschreibung und später auch bei der elektronenmikroskopischen Beurteilung nur diese beiden Knochenformationen berücksichtigt werden.

In der S c h ä d e l k a p s e l lassen sich lichtmikroskopisch dicht unter dem Ektoderm an den Stellen der späteren Knochenentwicklung als erstes Anzeichen dieses Differenzierungsvorganges plattenförmige Zellverdichtungen darstellen. Sie sind am Tag 16 voll ausgeprägt. Bei Anwendung der PAS-Methode enthalten diese Zellen zahlreiche glykogenhaltige Plaques. Am frühen Tag 17 beginnen in den zentral liegenden Verknöcherungspunkten der platten Knochen des Schädeldaches die ersten Anzeichen einer Grundsubstanzbildung (PAS-positives Material und Metachromasie) zwischen diese dicht gepackten Blastemzellen. Etwa 12 bis 24 Stunden später sind auch Kalkniederschläge vorhanden. Während der Knochenpunkt sich zunehmend ausbreitet, wird das Zentrum dicker und dichter, und mit der Aufhellungsmethode lassen sich feine bizarre Knochenbälkchen deutlich erfassen. Am Tag 18 (Mitte) ist die bereits verknöchernde Zone im Os parietale etwa

0,2 mm, am Tag 19 0,5mm $\pm$ 0,07, am Tag 20 1,6mm $\pm$ 0,11 groß. Die Einzelheiten sind aus Tab. 1 zu entnehmen.

In den o b e r e n E x t r e m i t ä t e n beginnt die lichtmikroskopisch faßbare Entwicklung ebenfalls mit einem Blastem aus dichtgepackten Mesenchymzellen. Dieses Stadium ist gut darstellbar am Tag 12. Da wir aber bei der Extremitätenentwicklung ein deutliches proximo-distales Reifungsgefälle haben, finden wir z.B. solche Blastembänder im Bereich des späteren Fingerskelets noch am Tag 15. Bei der Bildung der langen Röhrenknochen werden abweichend von den Vorgängen in der Schädelkapsel zwischen Blastembildung und Mineralisation noch weitere Stadien eingeschaltet. Wir sehen ab Tag 13 die Entwicklung des typischen Vorknorpels, am Tag 17 die Auftreibung der diaphysären Abschnitte im Vorknorpelstück des Humerus, Blasenknorpelentstehung und sehr schnell danach - besonders stark aber ausgeprägt am Tag 18 - die Mineralisation oder Verkalkung des Vorknorpels. Zur selben Zeit entsteht um den diaphysären Bereich eine sogenannte perichondrale Knorpelmanschette, die bei der Vitalfärbung bald den zentral liegenden verkalkten Vorknorpel überdeckt. Von hier aus erfolgt dann der Abbau des Vorknorpels und bei höherer Vergrößerung sind am Tag 18 beiderseits enchondral entstandene Knochenbälkchen sichtbar. An den folgenden Tagen laufen diese Vorgänge auch in den weiter distal liegenden Knochen ab, am Tag 19 sind in der oberen Extremität bereits

Radius und Ulna zu sehen, und am Tag 21 haben wir eine deutliche Verknöcherung an den Metatarsalia und den basalen Teilen der Phalangen. Über das Wachstum der Knochendia-
physe des Humerus unterrichtet Tabelle 2.

II. Elektronenmikroskopisches Bild:

Bei der elektronenmikroskopischen Untersuchung der desmalen Ossifikation zeigte es sich, daß die morphologischen Vorgänge - die im folgenden genauer beschrieben werden sollen - sowohl für das Os parietale als auch für die langen Röhrenknochen der oberen Extremität sowie für die verschiedenen Gebiete eines einzelnen Knochens gleich sind. Da also im Bereich der Feinstruktur keine Unterschiede zwischen den untersuchten Knochen bestehen, ist es berechtigt, in den Beschreibungen sowohl Lokalisation wie Zeitpunkt unberücksichtigt zu lassen. Es sollen deshalb im folgenden die Vorgänge der desmalen Ossifikation so beschrieben werden, daß sie eine gewisse Allgemeingültigkeit erhalten.

Sowohl im Gebiet des späteren Os parietale wie auch in der Peripherie der Diaphyse beginnt der Ossifikationsprozeß mit einer blastemartigen Verdichtung des Mesenchyms. Auf dem Höhepunkt dieser Verdichtungen finden sich nur kleine Interzellularräume, die keine elektronenmikroskopisch faßbare Struktur enthalten. Die Zellen selbst zeigen eine ausgeprägte Kontaktneigung. Auf langen Strecken verlaufen die benachbarten Zell-

membranen in einem Abstand von $200 \text{ \AA}$ parallel zu einander. Kleinere Fortsatzbildungen und Verzahnungen kommen nur selten vor. An einzelnen Stellen wird der Interzellularspalt schmaler ($< 100 \text{ \AA}$) oder verschwindet ganz. Die äußeren Lamellen der Zellmembran verschmelzen an diesen Stellen miteinander. Damit sind also spezialisierte Zellkontakte vorhanden: "close contacts" und "zonulae occludentes". Die Form der Zellen ist polygonal. Große plumpe Fortsätze können nach allen Seiten ausgesandt werden. Der Kern ist groß und enthält einen ebenfalls sehr großen, jedoch aufgelockerten Nukleolus. Zwischen seinen verdichteten Filament- und Granulasträngen finden sich aufgelockerte Bezirke, die Nukleolus-Vakuolen. Einzelne verdichtete Randchromatinbezirke kommen vor. Im Zytoplasma überwiegen freie Ribosomen, die zumeist in Form von Polysomen gruppiert sind. Bei günstiger Schnittrichtung können bis zu 30 Ribosomen pro Polysom gezählt werden. Daneben treten auch einige kurze Hohlräume des rauen endoplasmatischen Retikulums auf. Der Golgi-Apparat ist klein und vorwiegend vesikulär aufgebaut. Die wenigen Mitochondrien sind oval und enthalten einige senkrecht zur Längsachse stehende Cristae. In der Matrix mit mittlerer Elektronendichte ist meistens eine Aufhellung vorhanden - häufig an einem Pol - , die einen NASS-Körper ($1 \text{ DNS-Ringmolekül}$) enthält. Viele dieser Blastemzellen enthalten Areale mit dicht gepackten, etwa $350 \text{ \AA}$ großen, nach Bleicitrat-Kontrastierung besonders dicht erscheinenden

Granula. Es handelt sich um Glykogenkörnchen (γ -Form). Mit Beginn der Knochenbildung nimmt ihre Zahl rasch ab. Bei Einsetzen der Mineralisation sind sie verschwunden.

Im Verlauf der Reifung dieses knochenbildenden Blastems verändert sich das Bild der Zellen und der Interzellulärsubstanz. Der Zelleib wird zunehmend plumper und größer, gleichzeitig vermehrt sich das rauhe ER beträchtlich. Der Golgi-Apparat vergrößert sich deutlich, wobei sich auch der Aufbau ändert. Wir finden jetzt die typischen parallel gepackten flachen Säcke - umgeben von einem Hof von Granula und Vesikel. Auch die Zahl und Größe der Mitochondrien nimmt zu, der Cristae-Typ bleibt aber erhalten.

Während sich diese Differenzierungsprozesse in der Zelle abspielen, werden die Interzellulärräume größer. In ihnen lassen sich die ersten elektronenmikroskopisch faßbaren Strukturen nachweisen. Es handelt sich um kollagene Elemente und um Glykosaminoglykane (GAG). Das Kollagen läßt sich in verschiedenen Aggregationsformen darstellen. In diesen frühen Stadien treten zuerst feine Filamente von etwa $50 - 120 \text{ \AA}$ Dicke auf, die noch unregelmäßig verlaufen und regellos verteilt sind. Sie strecken sich allmählich, verlaufen dann gradlinig und werden dabei dicker. Mit einem Durchmesser von $150 \text{ \AA}$ wird die erste Querstreifung angedeutet sichtbar. Die Deutlichkeit der Querstreifung nimmt mit wachsender Dicke

zu. In den frühen Stadien der Interzellularsubstanz-Bildung im Knochenblastem finden wir diese Filamente und Fibrillen einzeln oder gruppiert. Fibrillen mit einer Querstreifung von $> 200 \text{ \AA}$ sind zunächst nicht zu beobachten. Kurz vor dem Sichtbarwerden von Kollagenstrukturen werden auch die Makromoleküle der GAG sichtbar. Sie lassen sich besonders gut mit der sogenannten Ruthenium-Rot-Methode darstellen. Dabei werden diese stark negativ geladenen Makromoleküle mit Ruthenium-Rot beladen und dadurch im Elektronenmikroskop sichtbar. Die GAG-Moleküle selbst stellen sich als dunkle $250 - 450 \text{ \AA}$ große Granula dar, von denen aus feine Fäden gradlinig oder schleifenförmig ausgehen. Die Dicke dieser Fäden liegt häufig an der Grenze des Auflösungsvermögens, also etwa bei $10 - 30 \text{ \AA}$. Auffällig ist die räumliche Beziehung dieser feinen Fäden zu den Kollagenfilamenten bzw. -fibrillen. Bei glücklicher Schnitterichtung sieht man entweder die Filamente oder das dichte Zentrum selbst an den Kollagenfäden ansetzen. Aber auch unabhängig davon kommen die GAG im optisch leeren Interzellularraum vor.

Die weitere Entwicklung ist charakterisiert durch eine zunehmende Sekretion von Interzellularsubstanz, besonders von Kollagen, und eine weitere Ausreifung von Mesenchymzellen. Morphologisch ist diese Differenzierung faßbar durch die weitere Vermehrung von rauhem endoplasmatischem Retikulum in das Zytoplasma, Vergrößerung der Zelle,

Vergrößerung des Golgi-Apparates und das gehäufte Auftreten von Vesikeln, Vakuolen und Granula. Dieses Bild entspricht in typischer Weise eine hochaktiven Bindegewebszelle, die große Mengen Protein - hier Kollagen und Protein-Anteil der GAG - synthetisiert und sezerniert. Sie ähnelt damit Mesenchymzellen aus anderen Bezirken mit starker Interzellulärsubstanz-Bildung. Allerdings besteht in der Form und Größe ein gewisser Unterschied: Die aktiven Mesenchymzellen aus dem desmalen Knochenblastem haben nicht die sonst typisch bipolare Gestalt, sie sind plump, polygonal oder rund und im allgemeinen größer als vergleichbare Fibroblasten. Darüber hinaus überrascht an ihnen die Fülle des rauen endoplasmatischen Retikulums.

Im jetzt deutlich erweiterten Interzellularraum nimmt die Zahl und die Dicke der Kollagenfibrillen deutlich zu. Sie erreichen eine Dicke bis $400 \text{ \AA}$ und ihre Querstreifung ist deutlich ausgeprägt. Daneben finden sich auch immer noch alle Stadien der Kollagenvorstufen, d.h. Filamente verschiedener Dicke und dünnere Fibrillen. Die Querstreifung hat eine typische Anordnung und kann bei hoher Auflösung in Streifen von A - E zerlegt werden. Dieser Vermehrung von kollagenen Strukturen geht ihre Bündelung einher. Sie lagern sich in zunehmendem Maße zu Bündeln aus 3 - 10, höchstens 20 Fibrillen zusammen, der Bündelverlauf ist völlig unregelmäßig. Die Zahl der Ruthenium-Rot-posi-

tiven GAG-Moleküle hat ebenfalls zugenommen. Auch hier findet man sie wieder geordnet an der Oberfläche der Fibrillen bzw. Fibrillenbündel oder unregelmäßig verstreut im Interzellularraum.

In diesem Stadium beginnt nun bereits die erste Einlagerung von kalkhaltigen Kristallen, die in Analogie zu biochemischen Untersuchungen als Ca-Apatit-Kristalle zu bezeichnen sind. Diese lanzettförmigen Kristalle sind ungefähr 50 - 60 Å breit und 400 - 700 Å lang. Die ersten Aggregate scheinen keinerlei Beziehungen zu präexistenten Strukturen zu haben. Zwar können manchmal ein oder mehrere Kollagenfibrillen das Kristallaggregat berühren oder in der Nähe vorbeiziehen, jedoch ist ein Aufwachsen der Kristalle an den Fibrillen in diesem frühen Stadium niemals zu beobachten. Allerdings findet man häufig eine etwas stärker ausgeprägte Elektronendichte im Grundsubstanzbereich des Aggregates. Die Kristalle selbst sind vorerst unregelmäßig angeordnet. Nachdem das Aggregat aber eine gewisse Größe erreicht hat, etwa 0,3 - 0,4 μ , ordnen sich die periphersten Kristalle radiär an. Diese Anordnung wird auch in den größeren Aggregaten beibehalten. In ihrem Inneren jedoch findet sich eine völlig regellose Lagerung. Während dieser Entwicklung nimmt die Zahl der 250 - 450 Å dicken Fibrillen mit deutlicher Querstreifung laufend zu. Die Vergrößerung der Kristallaggregate und die Zunahme der Fibrillenzahl bringt es natürlich mit sich, daß

beide Strukturelemente enge räumliche Beziehung zu einander bekommen. Von einem bestimmten Moment an wird der drusenförmige Niederschlag von den Ca-Apatit-Kristallen aufgegeben und die Kristalle ordnen sich - von den alten Aggregaten ausgehend - parallel zur Fibrillenlängsachse an ihrer Oberfläche an. Mit zunehmend dichter Lagerung der Kollagenfibrillen wird schließlich die kollagenabhängige Anordnung der Kristalle immer ausgeprägter. Schließlich zeigen alle Kristalle eine Ordnungsbeziehung zu den Kollagenfibrillen und verlaufen parallel zu den Fibrillen der sich verflechtenden Bündel des jetzt entstandenen Faserknochens. Die Zellen zeigen in Abhängigkeit von ihrer Lokalisation eine unterschiedliche Entwicklung. Die Osteoblasten, die in den Knochenverband selbst eingebaut werden, scheinen etwas kleiner zu werden, bilden teilweise unterschiedlich lange Fortsätze, und die Zahl ihrer Zellorganellen - besonders des rauhen endoplasmatischen Retikulums - wird geringer. Die Osteoblasten des Randgebietes dagegen behalten ihre plumpe Form bei ohne wesentliche Fortsatzbildung und sind weiterhin charakterisiert durch den reichlichen Gehalt an rauhem endoplasmatischem Retikulum.

DISKUSSION

Bei der Auswertung der lichtmikroskopischen, vor allem aber der Aufhellungspräparate fällt auf, daß die Mineralisationsprozesse und das Wachstum der Knochen bei den untersuchten Rattenfeten erst relativ spät, d.h. kurz vor der Geburt beginnt, dann aber schnell voranschreitet. Dieses Ergebnis stimmt mit den Vorstellungen überein, die der Ratte bei der Geburt eine extreme Nesthockerstellung zuzuwenden (STARCK, 1965). Zweifellos ist auch nach ihrem Skelettsystem beurteilt die Ratte, verglichen z.B. mit dem Menschen, als sehr unreif anzusehen. Dieses Verhalten hat gewisse praktische Konsequenzen für experimentell-embryotoxisch arbeitende Untersucher. Während bei der Ratte das Maximum der Mißbildungsentstehung in der Phase der Organogenese d.h. ungefähr zwischen Tag 10 bis 12 lokalisiert ist, müssen Störungen der Mineralisation und der eigentlichen Knochenentwicklung an das Ende der Schwangerschaft gelegt werden. Dieser Punkt scheint bei vielen experimentellen Ansätzen und Überlegungen noch nicht genügend berücksichtigt worden zu sein. Es wäre aber zweifellos notwendig, auch die Folgen eines späten Eingriffes am Skelettsystem zu testen.

Beim Vergleich unserer elektronenmikroskopischen Befunde mit den klassischen lichtmikroskopischen Beschreibungen fällt auf, daß eine gewisse Diskrepanz in der Definition

des Gewebes vorhanden ist, in dessen Bereich sich die desmale Ossifikation abspielt. Die lichtmikroskopischen Befunde lokalisieren den Beginn der desmalen Ossifikation in einem lockeren Gewebe mit weiten Interzellularräumen, das sich aus dem Knochenblastem entwickelt (GRAUMANN, 1951). Im Elektronenmikroskop dagegen läßt sich der Beginn der Mineralisationsprozesse schon sehr viel früher erfassen. Im elektronenmikroskopischen Bild entsteht also der desmale Knochen in einem Gewebe, das fast noch Blastemcharakter hat. Der Unterschied zwischen beiden morphologischen Aspekten liegt wahrscheinlich allein im differierenden Auflösungsvermögen beider Methoden. Im Gegensatz zu den lichtmikroskopischen Befunden fällt gerade bei der desmalen Ossifikation der schnelle Beginn der Kalk-einlagerung auf. Dieses Verhalten ist sogar als typisch für diese Ossifikationsart anzusehen. Hier wird bereits Kalk eingelagert, wenn die bindegewebige Interzellularsubstanz weder qualitativ noch quantitativ voll ausgereift ist. Im Vergleich mit der Verkalkung des Vorknorpels oder der Verknöcherung des Lamellenknochens ist dieser Unterschied besonders deutlich. In beiden Fällen wird zunächst eine organische Grundsubstanz abgelagert, - bei dem Lamellenknochen als Osteoid bezeichnet -, und erst dann erfolgt die Mineralisation (KNESE, 1963 a; MERKER, 1971). Bei der desmalen Verknöcherung laufen beide Vorgänge praktisch gleichzeitig ab. Ob dieser sehr schnelle Eintritt der Verknöcherung und damit der

Erwerb einer mechanischen Festigkeit eine funktionelle Bedeutung hat oder ein genetisch verankerter Vorgang ist, kann allein morphologisch nicht entschieden werden. Man könnte sich aber vorstellen, daß gerade bei der Ratte und anderen kleinen Laboratoriumstieren mit ihren sehr kurzen Tragezeiten und damit sehr kurzen Entwicklungsabläufen Schnelligkeit geboten ist. Bei der Entwicklung der Röhrenknochen ist die desmal entstandene diaphysäre Knochenmanschette funktionell sehr wichtig, um das sich auflösende Knorpelmodell zu stabilisieren. Gehen beide Vorgänge nicht synchron nebeneinander her, d.h. wird der verkalkte Knorpel abgebaut noch ehe die Knochenmanschette vorhanden ist, kommt es zu Verformungen des Skeletstückes oder sogar zu Mißbildungen. Die Notwendigkeit einer schnellen Knochenbildung wird dabei deutlich. Andererseits spricht das Vorkommen der desmalen Ossifikation in den platten Knochen der Schädelkapsel mehr für ein genetisch verankertes Geschehen.

Der schnelle Beginn der Mineralisation geht in einer Interzellulärsubstanz vor sich, die noch längst nicht ihre endgültige Reife erreicht hat. Die Glucosaminglykane und andere Bestandteile der Interzellulärsubstanz sind elektronenmikroskopisch zwar schlecht zu erfassen, jedoch sind außer gewissen quantitativen Aussagen Beurteilungen der Kollagenstrukturen möglich. Die Fibrillen machen einen morphologisch gut faßbaren Reifungsprozeß durch. Er beginnt mit der Synthese der Vorstufen

in den Fibroblasten und durchläuft einen Aggregationsprozeß im Extrazellularraum, der über Filamentvorstufen ohne Querstreifung, über dünne Vorstufen mit Querstreifung, schließlich zu den Fibrillen mit typischer Dicke gelangt. Am Ende dieser Entwicklung steht dann die Bindung von Fibrillenbildungen und die Prägung einer Textur (Lit. siehe MERKER, 1961; 1969; 1970; SCHWARZ, 1964). Am Beginn der Mineralisation im Bereich des desmalen Knochenblastems ist die Morphologie der Kollagenfibrillen noch deutlich unreif. Sie haben noch nicht die endgültige Dicke erreicht und liegen noch mehr oder weniger isoliert voneinander mit unregelmäßigem Verlauf im Extrazellularraum. Auch ihre Zahl entspricht noch längst nicht den späteren Verhältnissen. Bei der genauen elektronenmikroskopischen Lokalisation der Ca-Apatit-Kristallniederschläge wird deutlich, daß keinerlei räumliche Beziehung zu den Kollagenfibrillen besteht. Dieses Verhalten weicht deutlich von den bekannten Verhältnissen bei der Entstehung eines Lamellenknochen ab. Es liegt deshalb nahe, anzunehmen, daß den Kollagenfibrillen wegen ihrer Unreife eine Beeinflussung des Einbaumusters der Apatitkristalle nicht gelingt. Es müssen deshalb andere Mechanismen für den Ausfall der Kristalle verantwortlich gemacht werden. Morphologisch läßt sich nach allen bisherigen Befunden nur schwer zu den Mechanismen Stellung nehmen, die die Mineralisation in Gang bringen. Zweifellos spielt z.B. die alkalische Phosphatase eine wesentliche Rolle im Mineralisationsprozeß.

Ihre genaue Lokalisation ist aber bisher nicht bekannt (TELLER et al., 1971). Ob also ein Kalkfänger vorhanden ist oder der lokale Wegfall eines Hemmechanismus eine Rolle spielt oder ob schließlich eine aktive Sekretionsleistung der Zellen der auslösende Faktor ist, kann auch aus unseren Bildern nicht abgelesen werden (KNESE, 1958; 1963 a; TELLER et al., 1971). Allerdings ist es wegen der Entfernung der ersten Kristallniederschläge zu den Osteoblasten wenig wahrscheinlich, daß eine direkte Kalksekretion abläuft. Direkt an der Zellmembran liegende Apatit-Kristalle konnten niemals beobachtet werden. Auffällig ist, wie auch schon andere Untersucher angedeutet haben, die Verdichtung der Interzellulärsubstanz im Bereich der ersten Niederschläge. Einige Hinweise z.B. mit der Ruthenium-Rot-Methode scheinen oft für eine Anhäufung von Glycosaminoglykanen an diesen Stellen zu sprechen (POSENER, 1969; TAVES, 1965). Eine Ordnung der Kristalle findet jedenfalls in den ersten plaquesartigen Niederschlägen nicht statt, höchstens in der Peripherie überwiegen radiäre Anordnungen.

Gleichzeitig mit den ablaufenden Mineralisationsprozessen geht eine heftige Kollagensynthese vor sich. Die Zahl der Fibrillen nimmt schnell zu, ihre Bündelung wird deutlich und sie erreichen ihre endgültige Dicke. Erst jetzt beginnen sich die Apatitkristalle parallel und etagenartig an die Fibrillen anzulagern. Die vorhandenen Niederschläge gruppieren sich um, und schließlich

ist eine typische Kristall-Kollagen-Beziehung entstanden, bei der die Kristalle etagenartig parallel zur Längsachse der Fibrillen angeordnet sind.

Aus diesen Befunden kann geschlossen werden, daß für eine exakte räumliche Partnerschaft zwischen beiden Komponenten eine reife Fibrille notwendig ist. Da das am Beginn der desmalen Ossifikation zweifellos noch nicht der Fall ist, muß ein anderer Mineralisationsmechanismus durchgeführt werden, der dem im Vorknorpel und bei dystopen Verkalkungen entspricht.

ZUSAMMENFASSUNG

Bei unseren elektronenmikroskopischen Untersuchungen verwendeten wir Embryonen eines Ratten-Wistar-Inzuchtstammes. Wir untersuchten bei diesen Tieren Humerus und Schädelkapsel von Tag 11 bis Tag 21 ihres pre-natalen Alters und bedienten uns bei der Darstellung der Skelettentwicklung neben der elektronenmikroskopischen Untersuchungsmethode auch der klassischen lichtmikroskopischen Methode, des enzymhistochemischen Nachweises einer alkalischen Phosphatase und der Alizarin-Rot-Aufhellungs-Methode.

Im Elektronenmikroskop stellt sich die desmale Ossifikation wie folgt dar:
Aus einem Blastem mit dichtgepackten Mesenchymzellen, kleinen Interzellularräumen ohne elektronenmikroskopisch faßbare Strukturen und starker Kontaktneigung der Zellen (close contacts, zonulae occludentes) entwickelt sich ein Gewebe, das durch weitere Interzellularräume mit den ersten kollagenen Elementen in Form von $50 - 120 \text{ \AA}$ dicken Filamenten und den ersten $250 - 450 \text{ \AA}$ großen GAG-Granula gekennzeichnet ist. Von den Granula nehmen feine GAG-Fäden räumliche Beziehung zu den Kollagenfilamenten durch oberflächliche Anlagerung auf. Im Zuge der Fibrillenreifung kommt es bei einer Fibrillendicke von $400 \text{ \AA}$ und deutlich sichtbarer Querstreifung zum ersten Auftreten von Ca-Apatit-Kristallen, jedoch ohne räumliche Beziehung zwischen beiden

Strukturelementen. Die Kristalle lagern sich dichtgepackt zu Aggregaten ab.

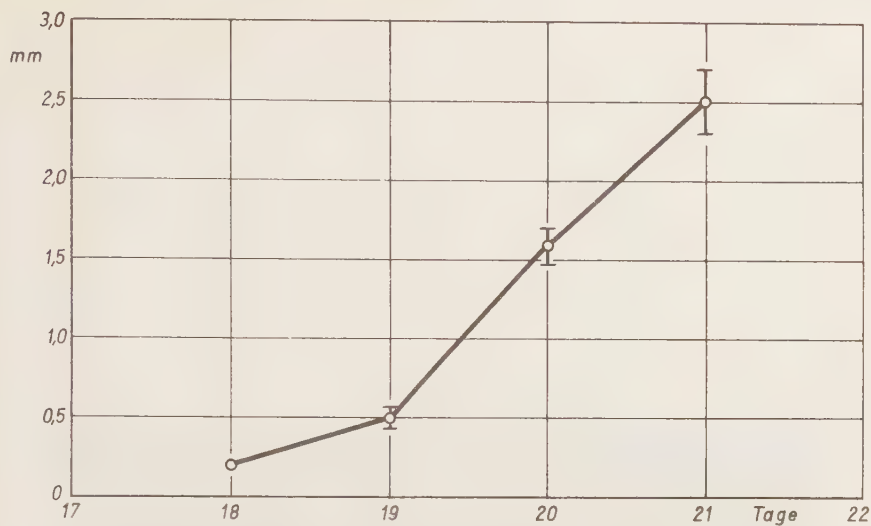
Eine Ordnung der regellos liegenden Kristalle erfolgt erst bei einer Aggregatgröße von 0,3 - 0,4 μ , indem sich die peripheren Kristalle radiär ausrichten. Eine parallele Anlagerung der Kristalle an die Fibrillenoberfläche findet jedoch erst dann statt, wenn sich in Folge der Aggregatvergrößerung und der stetigen Fibrillenvermehrung und -bündelung ein ausgesprochen enger räumlicher Kontakt ergibt.

Diskutiert wird, daß offensichtlich im desmalen Knochen keine Abhängigkeit der ersten Kalkniederschläge vom Reifegrad der Fibrillen besteht und deswegen ein anderer Mechanismus ähnlich dem bei der Verkalkung des Vorknorpels und bei der dystopen Verkalkung in Frage kommen muß. Die spätere Anordnung der Kristalle parallel zur Fibrillenlängsachse setzt allerdings eine reife Fibrille voraus.

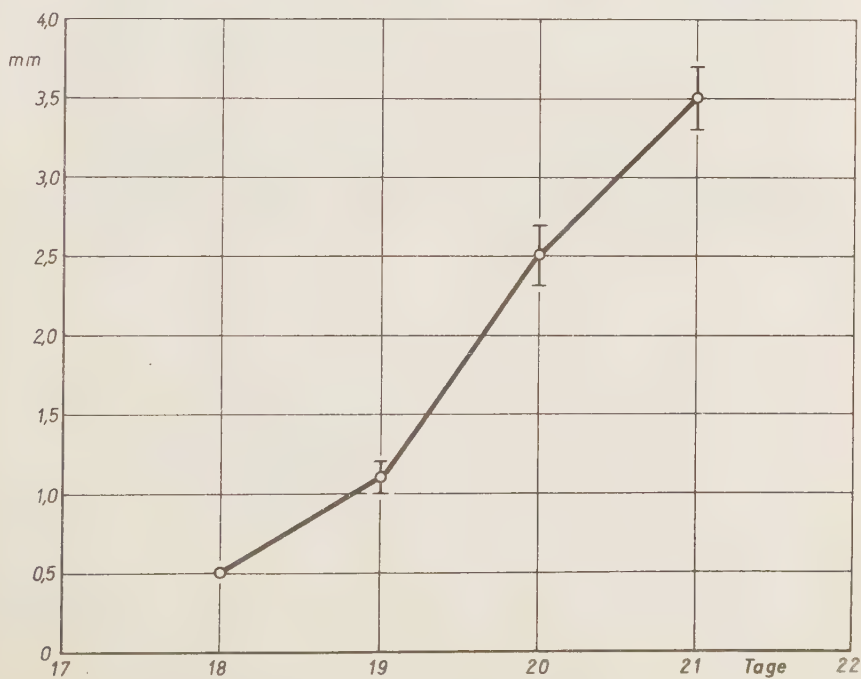
Lichtmikroskopisch stellt sich uns am Schädel die desmale Ossifikation wie folgt dar: am Tag 16 finden wir plattenförmige Zellverdichtungen unter dem Ektoderm, am Tag 17 die erste Grundsubstanzbildung im Zentrum und 12 - 24 h später hier erste Kalkniederschläge und Bildung bizarrer Knochenbälkchen. Diese Knochenkerne erreichen im Os parietale am Tag 20 einen Durchmesser von 1,6 mm $\pm$ 0,11. An der oberen Extremität ist am Tag 12 im Humerus ein Blastem aus dichtgepackten Mesenchymzellen sichtbar. Von Tag 13 - 18 findet

die Vorknorpelbildung, die diaphysäre Auftreibung und die Mineralisation des Blasenknorpels statt. Am Tag 18 entsteht im diaphysären Bereich eine perichondrale Knochenmanschette, von der aus der Vorknorpel abgebaut wird, und es treten die ersten Knochenbälkchen enchondral auf.

Am Tag 19 verknöchern Radius und Ulna, am Tag 21 die Metatarsalia und die basalen Teile der Phalangen. Die Knochendiaphyse des Humerus erreicht am Tag 20 eine Länge von $2,5 \text{ mm} \pm 0,18$.



Tab.1: Wachstum der Knochenkerne im Os parietale



Tab.2: Wachstum der Knochendiaphyse des Humerus

Abb. 1

Darstellung der mineralisierten Abschnitte des Kopfskeletes mittels einer Nachweismethode für alkalische Phosphatase

A : Querschnitt durch den Kopf eines Rattenfeten am Tag 16 : bei I Beginn der Verknöcherung der Schädelbasis, bei II der Maxilla, bei II A des Nasenseptums, bei III der Mandibula

B : Querschnitt durch den Kopf eines Rattenfeten am Tag 17 : bei I Verknöcherung der Schädelbasis, bei II der Maxilla, bei II A des Nasenseptums, bei III der Mandibula



Abb. 2

A : Längsschnitt durch die vordere Extremität eines Rattenfeten des Tages 17 : die periostale Knochenmanschette ist ausgebildet, Beginn der Mineralisation im Diaphysenbereich

B : Längsschnitt durch die vordere Extremität eines Rattenfeten des Tages 18 : Beginn der diaphysären Verkalkung im Bereich der Phalangen, enchondrale Verknöcherung im Diaphysenbereich von Radius und Ulna

C : Längsschnitt durch die vordere Extremität eines Rattenfeten des Tages 19 : enchondrale Ossifikation jetzt auch in den Ossa metacarpalia

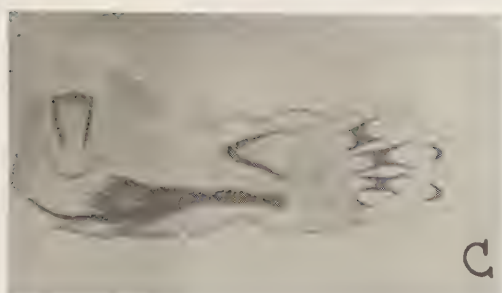


Abb. 3

Übersichtsbild aus dem Randgebiet zwischen Vorknorpel links unten und umgebendem Mesenchym rechts oben. Im Vorknorpelbereich blasig veränderte Zellen (Z), in der dazwischen liegenden Grundaustanz drusenartige Kalkeinlagerungen (X), im perichondralen Bereich die perichondrale Knochenmanschette (↓), anliegend Osteoblasten (O) mit reichlich endoplasmatischem Retikulum (ER), E = Erythrozyt im Kapillarbereich

Vergrößerung 1 : 3 500



Abb. 4

Rattenfet des Tages 18. Randbereich des Verknöcherungspunktes im Os parietale.

Im linken Bildteil noch dichtgepacktes Knochenblastem mit engen Interzellularräumen (↓). Im rechten Bildteil ein Interzellularraum mit kollagenen Fibrillenbündeln (O) und plaquesartigen Kalkniederschlägen (X). In den anliegenden Zellen reichlich rauhes endoplasmatisches Retikulum (ER). N = Nucleolus.

Vergrößerung 1 : 35 000

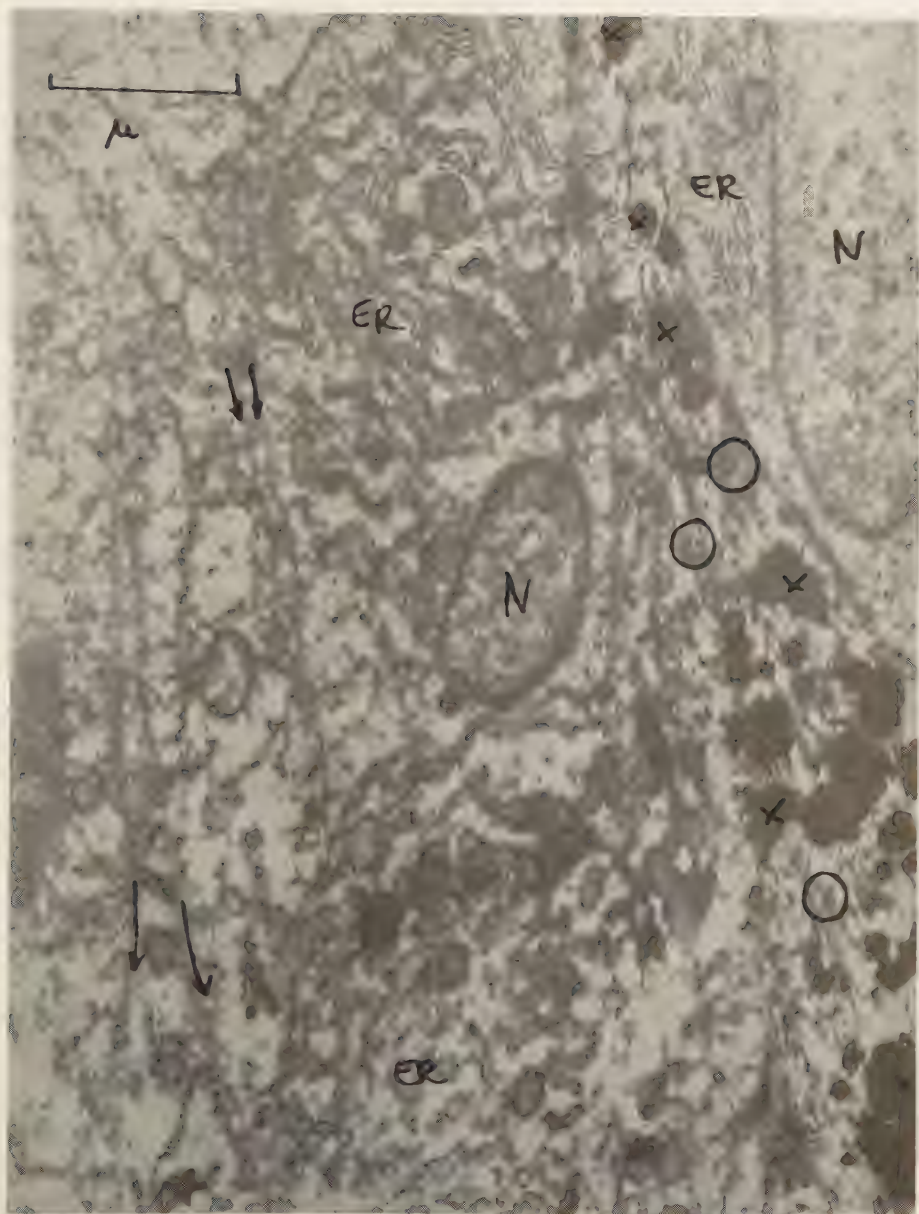


Abb. 5

Rattenfet des Tages 19. Epiphysäres Ende der perichondralen Knochenmanschette des Humerus. Im linken unteren Bildteil Interzellulärsubstanz des Vorknorpels (VK).Jenseits der perichondralen Knochenmanschette (pK) mit locker gepackten Kollagenfibrillen und Kalkdrüsen (*) ein großer Osteoblast mit reichlich rauhem ER (X)

Vergrößerung 1 : 35 000

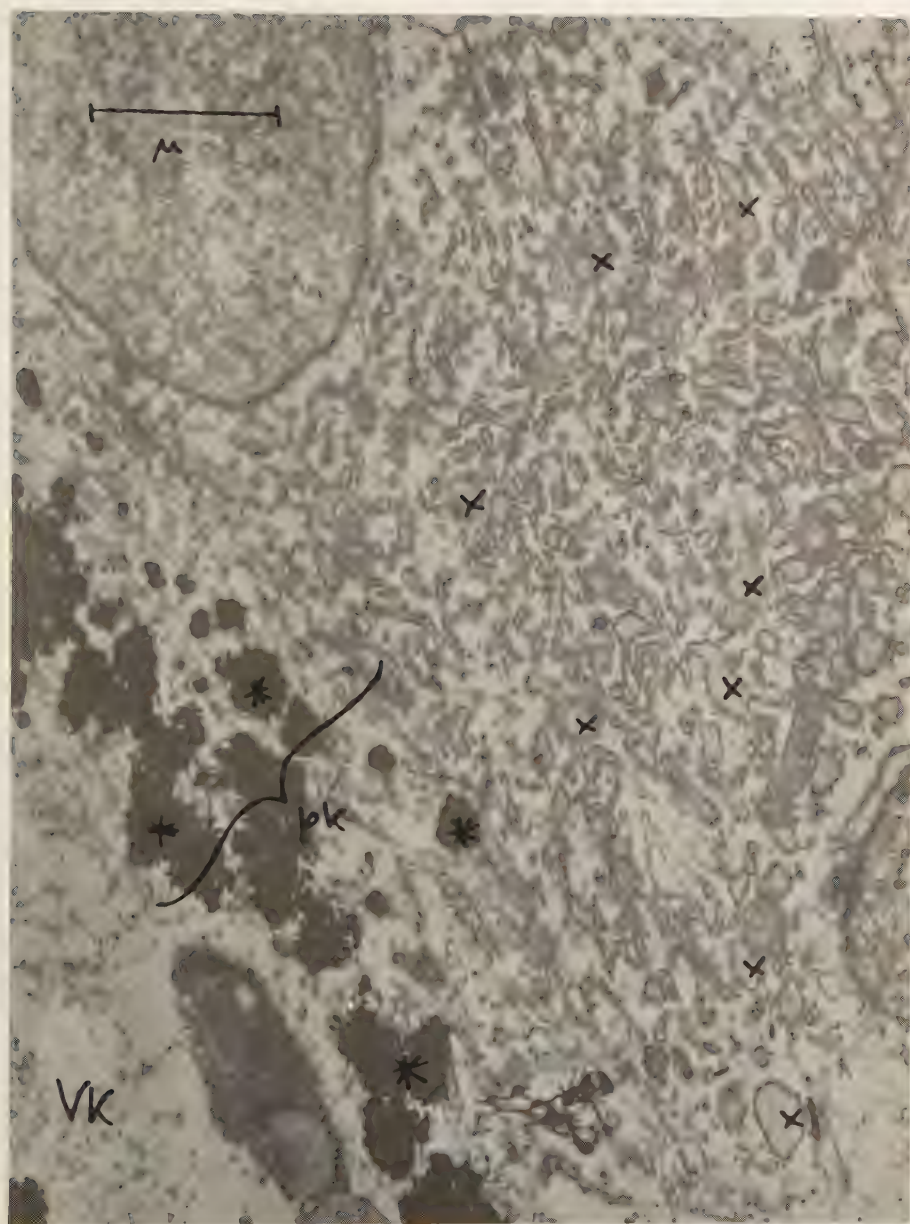


Abb. 6

Rattenfet des Tages 19. Perichondrale Knochenmanschette um den Humerus. ↑ = Richtung Vorknorpel, pK = eigentliche perichondrale Knochenmanschette. ↓ = beginnende Verdickung der pK mit kleineren Kalkplaques (X). Nach unten dichtgepackte (*) Osteoblasten mit reichlich rauhem ER

Vergrößerung 1 : 35 000

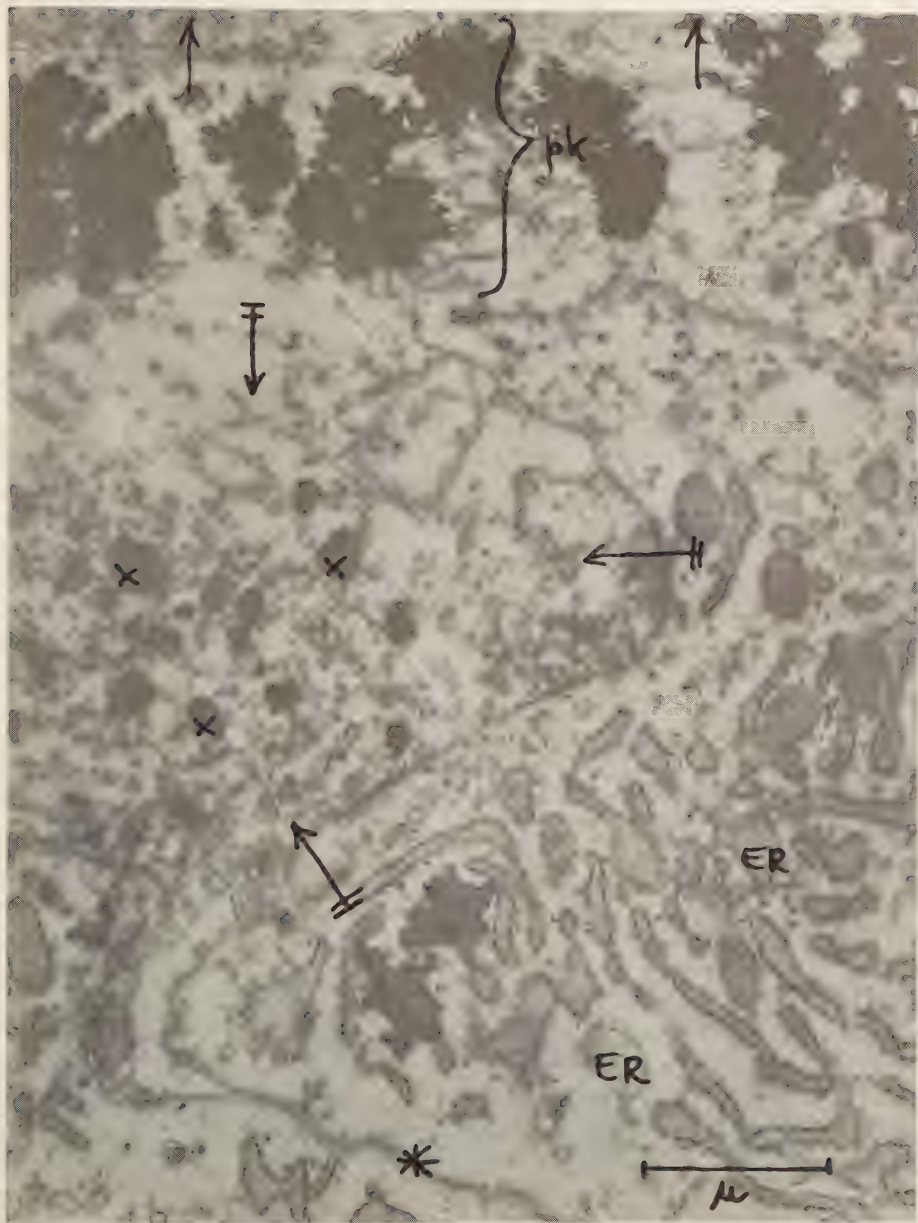


Abb. 7

Rattenfet des Tages 20. Randbereich des Verknö-
cherungspunktes im Os parietale. Osteoblast (O)
mit etwas rauhem ER. Im extrazellulären Raum
lockergepackte kollagene Fibrillen im Quer -
und Längsschnitt sowie unterschiedlich große,
teilweise bereits konfluierende Kalkplaques
(X)

Vergrößerung 1 : 45 000

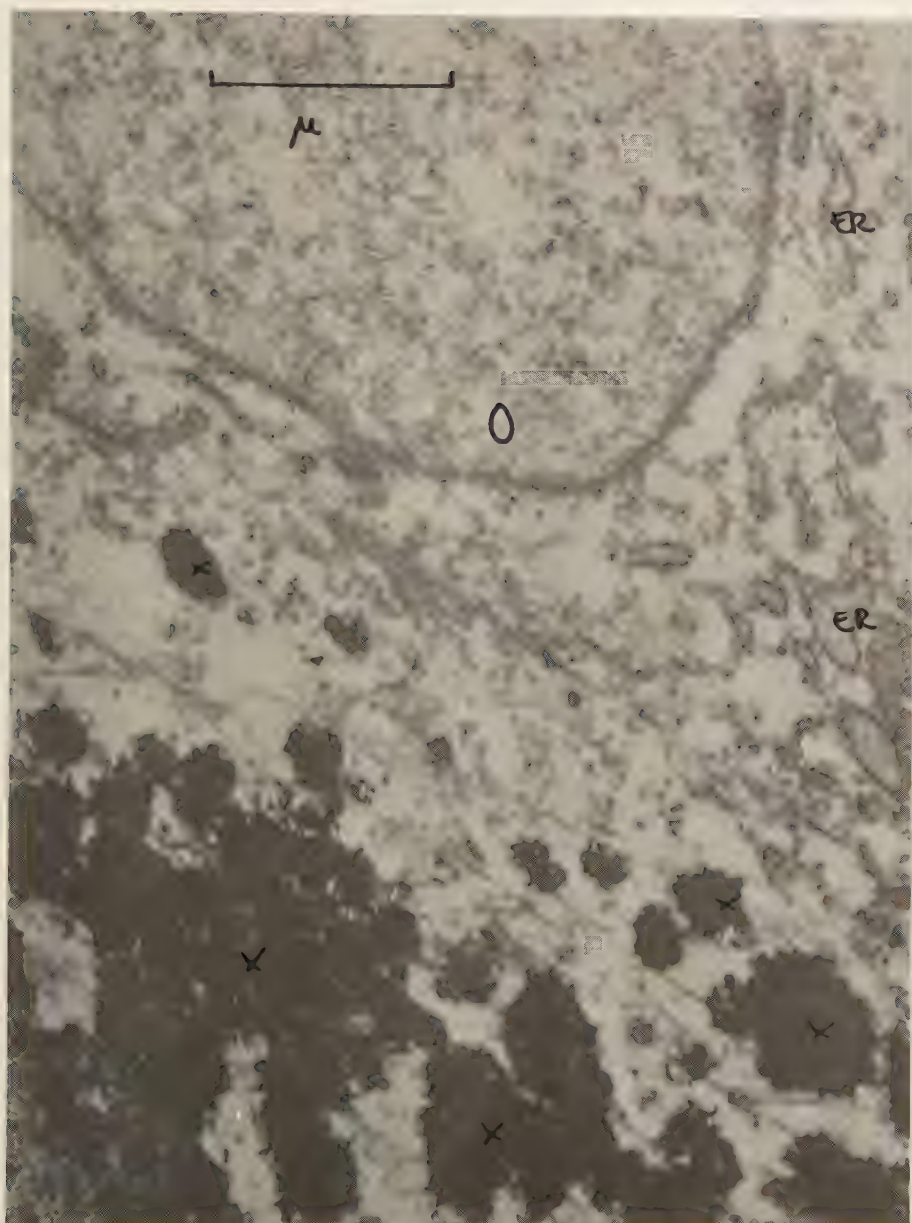


Abb. 8

Rattenfet des Tages 18. Perichondrale Knochenmanschette des Humerus. Grenzgebiet zwischen Vorknorpel (VK) mit Filamenten und perichondraler Knochenmanschette (pK) mit dickeren Fibrillen. Ca - Apatit - Kristalle ohne sichere räumliche Beziehung zu den kollagenen Strukturen (↓). Kleinere Kalk - Plaques häufig im Bereich einer verdichteten Interzellularsubstanz (X). Regellose Packung der Kristalle in den größeren Plaques, angedeutete radiäre Lagerung in der Peripherie.

Vergrößerung 1 : 100 000



Abb. 9

Neugeborene Ratte (Tag 21). Perichondrale Knochenmanschette des Humerus. Dichte Packung der wenig kontrastreichen Kollagenfibrillen. Parallele Ausrichtung der Ca - Apatit - Kristalle zu der Fibrillenlängsachse (↓) und angedeutete Ausrichtung entsprechend dem Querstreifungsmuster (⚡).

Vergrößerung 1 : 100 000



Abb. 10

Neugeborene Ratte (Tag 21).Os parietale.Voll
ausgeprägter Bindegewebsknochen.Ca - Apatit -
Kristalle parallel zur Längsachse der Kollagen-
fibrillen angeordnet (↓),häufig unter Beach-
tung der Fibrillenquerstreifung (⇓).

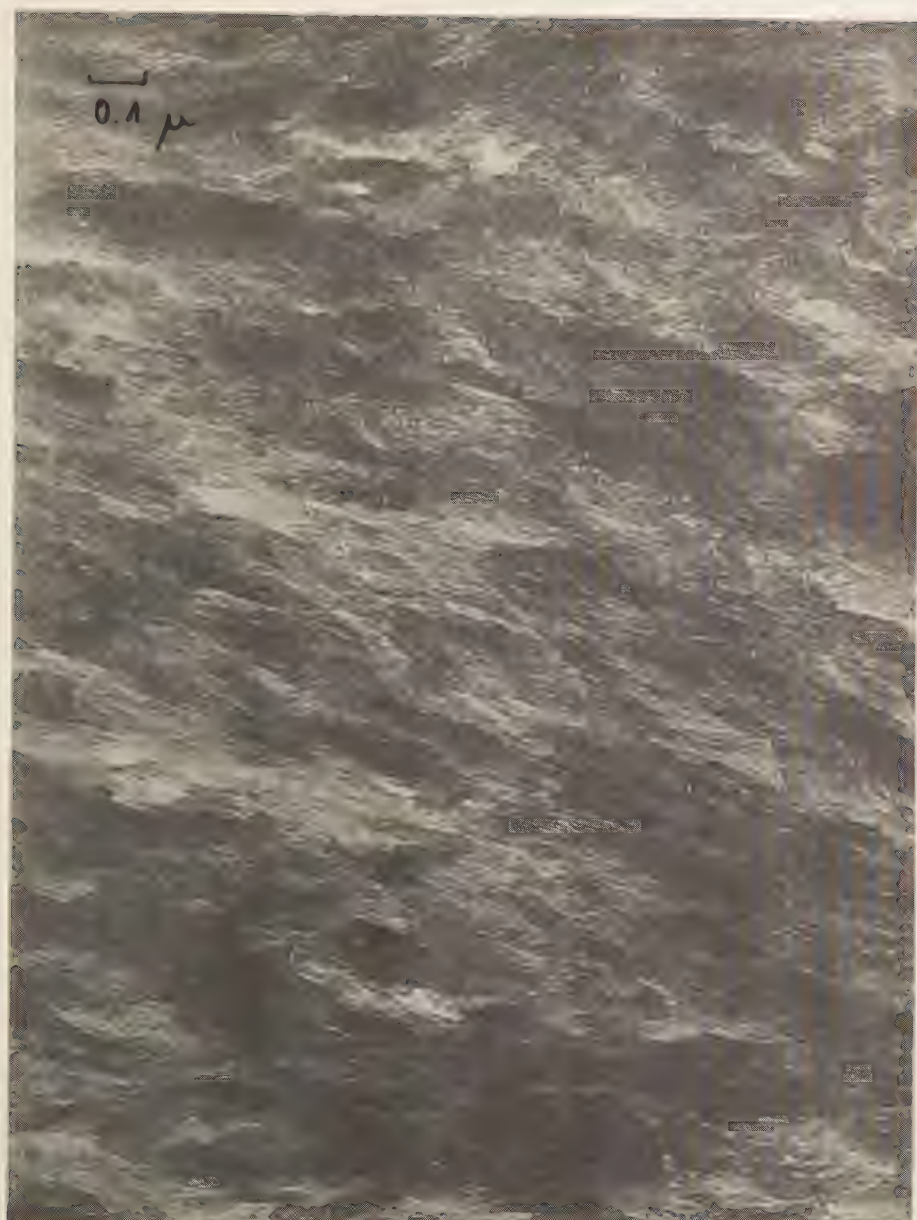
Vergrößerung 1 : 90 000



Abb. 11

Wie Abb. 10 , jedoch dickerer Schnitt. Die Ca - Apatit - Kristalle maskieren die unterliegende Matrix der Kollagenfibrillen. Einzelne Kristalle jedoch gut sichtbar.

Vergrößerung 1 : 110 000



LITERATURVERZEICHNIS

- AMPRINO, R. Autoradiographic research on S_{35} - sulphate metabolism in cartilage and bone differentiation and growth, in: Acta anat., 24, 121 - 163 (1955)
- On the growth of cortical bone and the mechanism of the osteon formation, in: Acta anat. (Basel), 52, 177 - 187 (1963)
- ASCENZI, A. Die Knochengewebsstruktur untersucht mit dem Elektronenmikroskop, in: Sci. med. ital., 8, 701 - 730 (1955)
- ASCENZI, A.
BENEDETTI, E.L. An electron microscopic study of foetal membranous ossification, in: Acta anat. (Basel), 37, 370 - 385 (1959)
- ASCENZI, A. et al. An electron microscope study on primary periosteal bone, in: J. Ultrastruct. Res. 18, 605 - 618 (1967)

- BARGMANN, W. Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen, Thieme Verlag Stuttgart 1967
- BUCHER, O. Cytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen, Med. Verlag Hans Huber, Bern Stuttgart Wien, 7. Aufl. 1970
- DZIALLAS, P. Zur Entwicklung des menschlichen Schädeldaches, in: Anat. Anz. 100, 236 - 242 (1954)
- Über das Verhalten der Diploevenen zu den Anlagen der Deckknochen des Schädels, in: Acta anat. (Basel) 34, 35 - 52 (1958)
- FRICK, H. Ein Beitrag zur Morphogenese des Kaninchenschädels, Acta anat., 24, 268 - 314 (1955)
- HECKMANN, U.
- GRAUMANN, W. Topogenese d. Bindegewebssknochen. Untersuchungen an Schädelknochen menschlicher Embryonen, in: Z. Anat. Entwicklungsgesch. 116, 14 - 26 (1951)

HARTMANN, A.

Zur Entwicklung des Bindegewebsknochens, in: Arch. mikr. Anat., 76, 253 - 787 (1910)

KNESE, K.H.

Die periostale Osteogenese und Bildung der Knochenstruktur bis zum Säuglingsalter, in: Z. Zellforsch., 44, 585 - 643 (1956 a)

Über die Mineralablagerung im Knorpel- und Knochengewebe unter Berücksichtigung elektronenmikroskopischer Befunde, in: Acta histochem. (Jena), Suppl. 3, 31 - 56 (1963 a)

Zell- und Faserstruktur des Knochengewebes, in: Acta anat. (Basel), 53, 369 - 394 (1963 b)

Struktur und Ultrastruktur des Knochengewebes, in: Handbuch der medizinischen Radiologie, Springer Verlag Heidelberg 1970

KNESE, H.K.

KNOOP, A.M.

Elektronenoptische Untersuchungen über die periostale Osteogenese, in: Z. Zellforsch., 48, 455 - 478 (1958)

MAIR, R.

Untersuchungen über das
Wachstum der Schädelknochen,
in: Z. Anat. Entwickl.
Gesch., 90, 293 - 342
(1929)

MERKER, H.J.

Elektronenmikroskopische
Untersuchungen über die
Fibrillogenese in der
Haut menschlicher Embry-
onen, in: Z. Zellf., 53,
411 (1961)

Das Knochengewebe, in:
Lehrbuch der Anatomie des
Menschen, BENNINGHOFF -
GOERTLER, Urban u.
Schwarzenberg Verlag,
München Berlin Wien, 1967
Bd. 1, hg. v. STAUBESAND

The Formation of Connective
tissue, in: The metabolic
pathways in mammalian
embryos during organogene-
sis and its modification
by drugs, 1. Symposium of
the "Sonderforschungsbereich 29", im Druck

Elektronenmikroskopische
Untersuchungen zum Problem
der Sekretion der bindege-
webigen Interzellulärsub-
stanz, in: Z. Zellf., 115,
212 - 225 (1971)

- POSENER, A.S. Crystal chemistry of bone mineral, in: *Physiol. Rev.*, 69, 760 (1969)
- RAJTOVA, V. The development of the skeleton in the guinea-pig. VI. Prenatal and postnatal ossification of the bones of the neurocranium in the guinea-pig (*cavia porcellus* L.), in: *Folia Morph. (Praha)*, 17, 48 - 55 (1969)
Cit. no. 3424215
- SCHWARZ, W. Fibrillogenese und Bildung der elastischen Fasern, in: *Arch. Biol.*, 75, 369 - 396 (1964)
- SOBEL, A.E. Local factors in the mechanism of calcification, in: *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 60, 713 - 731 (1955)
- STARCK, D. Embryologie, Georg Thieme Verlag Stuttgart 1965
- TAVES, D.R. Mechanism of Calcification, in: *Clin. Orthop.*, 42, 207 - 221 (1965)
- TELLER, C.
MERKER, H.J.
GÜNTHER, TH. Über das Verhalten und die Lokalisation der alkalischen Phosphatase während der Skelettentwicklung bei

Rattenfeten. Histochemie.
Im Druck

VILMANN, H.

The growth of the parietal bone in the albino rat studied by roentgenocephalometry and vital staining, in: Arch. Oral. Biol., 13, 887 - 901 (1968)

WRIGHT, H.V. et al.

Prenatal developments of the skeleton in Long-Evans-Rats, in: Anat. Rec., 130, 654 - 672 (1958)

YOUSSEF, E.H.

Development of the membrana bones and ossification of the chondrocranium in the albino rat, in: Acta anat., 72, 603 (1969)

LEBENS LAUF

- 7.3.1940 geboren in Posen als Tochter
des Pastors Wilhelm Brauer
und seiner Frau Gerda, geb.
Nau
- 1944/45 Flucht von Obornik/Warthe
nach Dillbrecht/Hessen
- 1947 - 56 Besuch der Dillbrechter Grund-
schule und anschließend des
humanistischen Zweiges des Re-
algymnasiums in Dillenburg
- 1956 - 61 Umzug nach Berlin, Besuch des
Steglitzer Gymnasiums und
Abitur dort
- 1961 - 69 Studium an der Freien Univer-
sität: Physikum 1965, Staatsex-
amen 1969
- 1971 Approbation als Ärztin

